

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 décembre 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/097068 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 5/06

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP02/06030

(22) Date de dépôt international : 30 mai 2002 (30.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/07167 31 mai 2001 (31.05.2001) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-
SERM [FR/FR]; Rue de Tolbiac 101, F-75564 PARIS
CEDEX 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ABER-
DAM, Daniel [FR/FR]; L'Estoril, Bât. B, Avenue Sainte
Claire 3, F-06100 NICE (FR). CORAUX, Christelle
[FR/FR]; Résidence Les Mûres, Rue Berlioz 43, F-06000
NICE (FR).

(74) Mandataires : VAN MALDEREN, Joëlle etc.; OFFICE
VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083
BRUXELLES (BE).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: KERATINOCYTES OBTAINED FROM EMBRYONIC STEM CELLS OF MAMMALS

(54) Titre : KERATINOCYTES OBTENUS A PARTIR DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES DE MAMMIFERES

(57) Abstract: The invention concerns a method for inducing keratinocyte differentiation of embryonic stem cells of mammals, comprising the following steps: isolating an extracellular matrix secreted by at least one type of mammalian cells; culturing in parallel embryonic stem cells of mammals in undifferentiated state in a suitable culture medium in the presence of LIF; seeding the embryonic stem cells in monolayer on said extracellular matrix; culturing the thus seeded embryonic stem cells in the absence of LIF for a time interval sufficient for their keratinocyte differentiation; and collecting the thus obtained keratinocytes.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à une méthode d'induction de la différenciation de cellules souches embryonnaires de mammifères en kératinocytes, comprenant les étapes suivantes : - isolement d'une matrice extracellulaire sécrétée par au moins un type de cellules de mammifères, - culture en parallèle des cellules souches embryonnaires de mammifères à l'état indifférencié dans un milieu de culture approprié en présence de LIF, - ensemencement des cellules souches embryonnaires en monocouche sur ladite matrice extracellulaire, - culture des cellules souches embryonnaires ainsi ensemencées en absence de LIF pendant un délai suffisant pour leur différenciation en kératinocytes, et - recueillement des kératinocytes ainsi obtenus.

WO 02/097068 A2

5

KERATINOCYTES OBTENUS A PARTIR DE CELLULES SOUCHES
EMBRYONNAIRES DE MAMMIFERES

Objet de l'invention

10 [0001] la présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires de mammifères.

[0002] Une application thérapeutique possible d'un tel procédé est la reconstitution de tissus dérivés des
15 kératinocytes, en particulier, la fabrication de peau artificielle.

Etat de la technique

[0003] Le nom de « matrice extracellulaire » ou
20 « MEC » est le nom généralement donné au réseau complexe de macromolécules extracellulaires avec lequel sont en contact la plupart des cellules des organismes pluricellulaires.

[0004] La composition de la matrice extracellulaire et sa forme varient en fonction du tissu, de sorte que l'on
25 parle plus volontiers des matrices extracellulaires, que de la matrice extracellulaire. Néanmoins, les matrices extracellulaires ont en commun d'être constituées de macromolécules qui sont essentiellement des protéines et des polysaccharides sécrétés localement et qui s'organisent
30 pour former un réseau en trois dimensions au niveau des espaces intercellulaires de la plupart des tissus.

[0005] Parmi ces macromolécules, on trouve par exemple des protéoglycannes, des protéines fibreuses ayant une fonction essentiellement structurale telles que

l'élastine et les collagènes, et des protéines fibreuses ayant une fonction essentiellement d'adhésion telles que la fibronectine et les laminines.

[0006] La matrice extracellulaire n'est pas
5 seulement une « glue » biologique, elle forme aussi des structures hautement spécialisées telles que le cartilage, les tendons, la membrane basale laminaire, le squelette et les dents.

[0007] En outre, il apparaît que les matrices
10 extracellulaires jouent un rôle critique dans la régulation du comportement des cellules avec lesquelles elles sont en contact. Elles sont ainsi impliquées dans des phénomènes aussi différents que le développement cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la forme et la polarité des
15 cellules. Un autre phénomène dans lequel les matrices extracellulaires interviennent est la différenciation des cellules.

[0008] Les cellules souches embryonnaires dérivent de cellules totipotentes de l'embryon. Ce sont des cellules
20 pluripotentes capables de se différencier in vivo en n'importe quel type cellulaire (Bradley et al., *Nature* 309, 255-256 (1984) ; Nagy et al., *Development* 110, 815-821 (1990)) et in vitro en un nombre plus restreint de types cellulaires (Doetschman et al., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87,
25 27-45 (1985) ; Wobus et al., *Biomed. Biochim. Acta* 47, 965-973 (1988) ; Robbins et al., *J. Biol. Chem.* 265, 11905-11909 (1990) ; Schmitt et al., *Genes and Development* 5, 728-740 (1991)).

[0009] Cependant, les cellules souches embryonnaires
30 sont difficiles à cultiver en laboratoire et leur culture nécessite l'ajout, dans le milieu de culture, d'un facteur inhibant la différenciation, communément appelé le « LIF » (Leukemia Inhibitory Factor), afin d'éviter tout phénomène de différenciation spontanée (Williams et al., *Nature* 336,

684-687 (1988) ; Smith et al., *Nature* 336, 688-690 (1988) ; Gearing et al., *Biotechnology* 7, 1157-1161 (1989)).

[0010] Le LIF est une protéine de sécrétion qui peut être fournie en maintenant des cellules souches embryonnaires sur une couche nourricière de cellules produisant ce LIF (E.J. Robertson, *Tetracarcinomas and Embryonic stem cells: a practical approach*, Washington DC, IRL Press (1987)) ou, en absence de couche nourricière, en ajoutant au milieu de culture du LIF purifié (Pease et al.,
10 *Exp. Cell. Res.* 190, 209-211 (1990)).

[0011] Il a été démontré que la différenciation spontanée de cellules souches embryonnaires se produit dès l'instant où l'on supprime le LIF du milieu de culture où ces cellules se trouvent, et qu'elle peut être également
15 induite par manipulation dans certaines conditions (Gutierrez-Ramos et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89, 9111-9175 (1992)).

[0012] Cette différenciation a lieu sous l'effet de l'agrégation des cellules souches embryonnaires, conduisant
20 à la formation de corps embryoides (structures tridimensionnelles) à partir desquels les cellules se différencient spontanément en différents types cellulaires.

[0013] Rudnicki et al. ont décrit une méthode générale d'induction de la différenciation de cellules
25 souches embryonnaires dite « méthode des gouttes pendantes » (Rudnicki et al., « Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines », in *Teratocarcinomas and embryonic stem cells : a practical approach*, (E.J. Robertson, op. cit.), 19-49
30 (1987), IRL Press, Oxford). Dans cette méthode, pour que les cellules souches embryonnaires se différencient, il est nécessaire de former des structures tridimensionnelles appelées « corps embryoides » dont il a été fait mention ci-dessus.

[0014] L'absence de LIF au cours de cette méthode est nécessaire pour permettre aux cellules souches embryonnaires de se différencier. Après 3 jours, les corps embryoides formés sont transférés sur des boîtes de Pétri
5 bactériologiques et sont maintenus en suspension pendant 2 jours, afin d'éviter leur adhésion et de favoriser leur croissance. Les corps embryoides sont ensuite mis à adhérer sur des boîtes de culture cellulaire. Dès le 2^{ème} jour après adhésion, on peut observer, au sein de ces corps,
10 différents types cellulaires, dont des cellules battantes (cardiomyocytes). Selon les conditions de culture utilisées, on identifie des cellules musculaires squelettiques et lisses, des cellules nerveuses, des cellules de la glie et des dérivés du système
15 hématopoïétique (Rathjen et al., « Properties and uses of embryonic stem cells : prospects for application to human biology and gene therapy », *Reprod. Fertil. Dev.* 10(1), 31-47 (1998) , Review).

[0015] Depuis peu, des conditions de culture
20 permettant d'induire majoritairement et de manière reproductible la différenciation des cellules souches embryonnaires vers un lignage particulier ont été mises au point (Rathjen et al., op. cit.).

[0016] Il est désormais clairement établi que le LIF
25 maintient les cellules souches embryonnaires pluripotentes sous forme indifférenciée, et que son retrait du milieu cellulaire permet à ces cellules d'initier, sous forme de corps embryoides, un programme de différenciation.

[0017] Le document de Bagutti et al. (Bagutti et
30 al., *Developmental Biology* 179, 184-196 (1996)) décrit plus particulièrement la différenciation spontanée de cellules souches embryonnaires de souris en kératinocytes en utilisant la méthode des gouttes pendantes, avec apparition de kératinocytes à partir du 21^{ème} jour.

[0018] Néanmoins, il n'existe pas encore actuellement de méthode d'induction de la différenciation des cellules souches embryonnaires en kératinocytes qui constituerait une réelle alternative, en terme de rapidité
5 et de rendement, à la méthode des gouttes pendantes.

Buts de l'invention

[0019] La présente invention vise à fournir une méthode et des moyens d'induction de la différenciation de
10 cellules souches embryonnaires en kératinocytes, qui permettent d'obtenir plus rapidement et en nombre plus grand des kératinocytes différenciés, comparativement aux méthodes de l'état de la technique.

[0020] La présente invention vise également à
15 fournir une méthode et des moyens d'induction de la différenciation de cellules souches embryonnaires de mammifère en kératinocytes qui soient reproductibles et fiables.

Résumé de l'invention

[0021] La présente invention se rapporte à l'obtention de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires de mammifères, en particulier à une méthode d'induction de la différenciation de cellules souches
25 embryonnaires de mammifères en kératinocytes, comprenant les étapes suivantes:

- on isole une matrice extracellulaire sécrétée par au moins un type de cellules de mammifères,
- on cultive parallèlement des cellules souches
30 embryonnaires de mammifères à l'état indifférencié dans un milieu de culture approprié,
- on ensemence ensuite lesdites cellules souches embryonnaires en monocouche sur ladite matrice extracellulaire ou sur une ou plusieurs de ses fractions

comprenant des constituants particuliers, notamment la laminine-5, le collagène de type IV, le collagène de type I ou des fibronectines,

- on cultive ensuite lesdites cellules souches embryonnaires ainsi ensemencées, en absence du LIF susmentionné pendant un délai suffisant pour obtenir la différenciation en kératinocytes, et
- on recueille les kératinocytes ainsi obtenus, isolés et amplifiés par des techniques connues de clonage (dispase, trypsine, tri cellulaire).

[0022] De manière avantageuse, les cellules souches embryonnaires sont maintenues préalablement à l'état indifférencié en présence de LIF, de préférence à une concentration de l'ordre de 10^3 unités/ml de culture.

- 15 [0023] Selon l'invention, l'induction de la différenciation des cellules souches embryonnaires sur une matrice extracellulaire est initiée dès 8 jours et largement engagée à 15 jours. Ce facteur de temps n'est nullement limitatif et peut être accéléré par différents
- 20 procédés adaptables par l'homme du métier.

[0024] En outre, il est également possible de traiter les souches embryonnaires avant la différenciation en kératinocytes par différentes modifications génétiques, en particulier par des modifications génétiques sur des

25 gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), de manière à créer des lignées pluripotentes universelles immunotolérantes.

[0025] De façon particulièrement avantageuse, les cellules souches embryonnaires ensemencées sur la matrice

30 extracellulaire sont cultivées en présence de BMP-4 et d'acide ascorbique.

[0026] Un autre aspect de la présente invention concerne la fabrication d'une peau artificielle, en particulier un tissu épidermique comprenant lesdits kératinocytes ainsi obtenus, ainsi que leur utilisation
5 pour soigner des patients victimes de plaies thermiques (en particulier des grands brûlés), des plaies vasculaires (tels que des ulcères) ou des patients atteints de pathologies liées à des défauts de cicatrisation.

[0027] La présente invention sera détaillée à l'aide
10 de la description d'une forme d'exécution préférée de l'invention présentée à titre d'illustration non limitative de l'objet de l'invention.

Description détaillée de l'invention

15 [0028] Les exemples présentés ci-dessous illustrent la méthode selon la présente invention. Dans ces exemples, une lignée de cellules souches embryonnaires murines CGR8 (Mountford et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4303-4307 (1994)), au stade blastocyste, a été cultivée à l'état
20 indifférencié en présence de *LIF* (Leukemia Inhibiting Factor) (10^3 unités/ml) sur des boîtes de culture préalablement gélatinisées (0,1% dans du PBS) en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

[0029] Le milieu de culture se composait de
25 GMEM/BHK21 (Glasgow's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF; Hyclone), 0,23% de bicarbonate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 2 mM de glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 0,1 mM de β -mercaptoéthanol.

30 [0030] Ces cellules souches embryonnaires à l'état indifférencié ont ensuite étéensemencées, en absence de *LIF*, soit sur un substrat amorphe (verre ou plastique, contrôle négatif), soit sur de la gélatine, soit sur des

lames coatées de matrice extracellulaire provenant de différents types de cellules (voir ci-dessous). On a ainsi testé des cellules d'origine épithéliale (lignée 804G; lignée Rac-11P; lignée SCC25; lignée MCF-10 A; lignée KHSV; 5 lignée NBT_{II}; lignée HaCaT) et des cellules fibroblastiques (lignée J2; lignée NIH-3T3, fibroblastes dermiques humains en culture primaire). Les lignées épithéliales produisent, entre autre, des quantités importantes de laminine-5, et forment *in vitro* de nombreuses structures d'ancrage de type 10 hémidesmosome (Langhofer M. et al., *J. Cell Science* 105, 753-764 (1993)).

[0031] Les cellules souches embryonnaires ont également étéensemencées sur des lames coatées uniquement avec des constituants majeurs des lames basales (laminine-5 15 purifiée; collagène de type IV purifié; collagène de type I purifié; fibronectines purifiées).

[0032] Afin de récolter leur matrice extracellulaire, les lignées mentionnées ci-dessus ont été cultivées à confluence sur lamelles. Une fois arrivées à 20 confluence, ces cellules ont été décollées grâce à une solution constituée de PBS contenant 20mM d'hydroxyde d'ammonium ou à une solution d'HBSS (Hanks balanced salt solution, GIBCO-BRL) contenant 20 mM d'EDTA, 20 mM d'Hepes et 1 mM d'EGTA) de manière à ne garder que la matrice 25 extracellulaire sécrétée, intacte sur les lamelles. Les lamelles ainsi "coatées" ont été conservées à 4°C.

[0033] La présence de kératinocytes a été évaluée par marquage immunofluorescent avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les cytokératines 14 30 (K14; Sigma) et 5 (Dr. B. Lane, Université de Dundee, UK). Les cytokératines 14 et 5 font partie des filaments intermédiaires spécifiques des kératinocytes basaux. Les cellules souches embryonnaires ont été cultivées sur des lamelles de verre stériles avec ou sans dépôt de matrice

extracellulaire. Après lavage au PBS, les cellules ont été fixées avec du méthanol froid 10 minutes à -20°C . Les cellules ont ensuite été lavées au PBS avant d'être incubées pour une heure avec l'anticorps primaire anti-K14
5 (dilué au $1/100^{\circ}$ dans un tampon PBS contenant 3 mg/ml de BSA, en chambre humide) ou avec l'anticorps primaire anti-K5 (dilué au $1/5^{\circ}$ dans le même tampon, en chambre humide). Après un nouveau lavage au PBS de 5 minutes, les lamelles ont été incubées pour une heure à l'obscurité avec un
10 anticorps secondaire relevant couplé à un marqueur. Après un dernier rinçage, les lamelles ont été incubées avec un marqueur nucléaire (Hoechst ou iodure de propidium) dilués au $1/1000^{\circ}$ dans du PBS pendant 10 minutes à l'abri de la lumière, puis montées sur lames après lavage à l'eau
15 distillée. Toutes les manipulations ont été effectuées à température ambiante. Les lames ont été observées sous un microscope "Zeiss Axiophot".

[0034] Les résultats obtenus ont montré que sur support amorphe, malgré une différenciation spontanée et
20 anarchique, les cellules ne se différencient pas en kératinocytes, même après 15 jours de culture sans LIF. Les résultats sur gélatine ont montré que seulement une proportion infime de cellules souches embryonnaires CGR8 s'est différenciée en kératinocytes: une présence
25 sporadique de kératinocytes peut être observée à 8 jours de culture, et cette proportion est augmentée au 15° jour, les kératinocytes observés restant en majorité isolés, ne formant pas d'amas.

[0035] Les résultats obtenus sur des lames coatées
30 avec une fraction totale ou partielle de la matrice extracellulaire des types cellulaires se sont révélés dramatiquement différents des résultats obtenus sur support amorphe.

Résultats obtenus sur la matrice extracellulaire provenant
des différents types cellulaires utilisés

[0036] Une différenciation kératinocytaire a été obtenue sur les différentes matrices extracellulaires étudiées. Cependant, les variations d'efficacité d'induction entre ces différentes matrices nécessitent de les répartir en deux catégories distinctes: (A) matrices à haute capacité d'induction; (B) matrices à capacité moyenne d'induction (voir aussi tableau I).

10 (A) Matrices à haute capacité d'induction de la différenciation kératinocytaire

a) - Matrice extracellulaire produite par les cellules FHN: Les FHN (fibroblastes humains normaux) ont été obtenus à partir de biopsies de prépuce et entretenus en DMEM
15 (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone). Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur. A confluence, les cellules FHN ont été décrochées et les cellules souches embryonnaires CGR8 ont
20 étéensemencées sur la matrice extracellulaire déposée par les cellules FHN.

[0037] Au huitième jour de culture des cellules souches embryonnaires CGR8 sur la matrice produite par les FHN, de nombreux kératinocytes isolés sont identifiables
25 par immunofluorescence. Au quinzième jour de culture, les kératinocytes plus nombreux sont observés en larges amas ("patches") formant une sorte de feuillet épidermique. De nombreux kératinocytes isolés sont également détectables.

[0038] Ainsi, la présence de matrice sécrétée par
30 les cellules FHN provoque un effet significatif sur la différenciation des cellules souches embryonnaires en kératinocytes. En effet, alors qu'aucune différenciation n'est observée en culture directe sur un substrat amorphe même après 15 jours de culture, une quantité importante de

kératinocytes est obtenue en culture directe sur la matrice extracellulaire produite par les cellules FHN. De plus, cette différenciation est plus précoce que celle obtenue via les corps embryoïdes puisque dès le huitième jour de culture en monocouche sans LIF, une proportion importante de kératinocytes est observée.

b) - Matrice extracellulaire produite par les lignées cellulaires NIH-3T3, Rac-11P, KHSV et NBT_{II}:

[0039] L'expérience susmentionnée (cellules FHN) a été reproduite sur la matrice produite par les lignées cellulaires:

i) NIH-3T3: ATCC, CRL 1658. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone). Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

ii) Rac-11P: Sonnenberg A. et al. (1996) J. Cell Science 106: 1083. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone). Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

iii) KHSV: Miquel C. et al. (1996). Exp. Cell Res. 224: 279-290. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) contenant 50% de milieu Ham F12 (GIBCO BRL) et supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone), 0,4 µg/ml d'hydrocortisone, 0,1 ng/ml de toxine cholérique et 10 ng/ml d'Epidermal Growth factor. Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

iiii) NBT_{II}: ATCC CRL 1655. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone). Les

cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

[0040] Dans ces quatre autres exemples, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus avec la matrice des
5 cellules FHN. En effet, le dépôt de cellules souches embryonnaires sur les lames coatées avec de la matrice extracellulaire produite par ces lignées cellulaires conduit à l'apparition de kératinocytes K14-positifs dès le huitième jour de culture en monocouche. Les différences
10 qualitative et quantitative sont représentées sur le tableau I.

(B) Matrices à capacité moyenne d'induction de la différenciation kératinocytaire

a) - Matrice extracellulaire produite par la lignée 804G:

15 La lignée 804G, dérivée de cellules épithéliales de vessie de rat (Riddelle KS et al., *J. (1991) J. Cell Biol.* 112, 159-168), a été préalablement cultivée en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone). Les cellules ont été maintenues en
20 atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur. A confluence, les cellules 804G ont été décrochées et les cellules souches embryonnaires CGR8 ont étéensemencées sur la matrice extracellulaire déposée par les cellules 804G.

25 [0041] Au huitième jour de culture des cellules souches embryonnaires CGR8 sur la matrice produite par les 804G, des kératinocytes isolés sont identifiables par immunofluorescence. Au quinzième jour de culture, des kératinocytes plus nombreux sont également détectables.

30 [0042] Ainsi, la présence de matrice sécrétée par les cellules 804G provoque un effet significatif sur la différenciation des cellules souches embryonnaires en kératinocytes. En effet, alors qu'aucune différenciation n'est observée en culture directe sur un substrat amorphe

même après 15 jours de culture, une quantité importante de kératinocytes est obtenue en culture directe sur la matrice extracellulaire produite par les cellules 804G. De plus, cette différenciation est plus précoce que celle obtenue
5 via les corps embryoides puisque dès le huitième jour de culture en monocouche sans LIF, une proportion importante de kératinocytes est observée. Les différences qualitative et quantitative sont représentées sur le tableau I.

b) - Matrice extracellulaire produite par les lignées
10 cellulaires SCC25, MCF-10A et HaCaT:

[0043] L'expérience susmentionnée (cellules 804G) a été reproduite sur la matrice produite par les lignées cellulaires:

i) SCC25: ATCC CRL 1628. Ces cellules ont été entretenues
15 en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) contenant 50% de milieu Ham F12 (GIBCO BRL) et supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone) et 0,4 µg/ml d'hydrocortisone. Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

20 ii) MCF-10A: ATCC CRL 10317. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) contenant 25% de milieu Ham F12 (GIBCO BRL) et supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone), 1,5 ng/ml de triiodo-L-thyronine, 5µg/ml d'insuline, 0,5 µg/ml
25 d'hydrocortisone, 20 µg/ml d'adénine, 5 µg/ml d'apoptotransferrine et 2 ng/ml d'Epidermal Growth Factor. Les cellules ont été maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

iii) HaCaT: Boukamp P. et al. (1988). J. Cell Biol. 106:
30 761-771. Ces cellules ont été entretenues en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - GIBCO BRL) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone) et 1% de solution d'acides aminés non essentiels. Les cellules ont été

maintenues en atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO² dans un incubateur.

[0044] Dans ces trois autres exemples, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus avec la matrice des
5 cellules 804G. En effet, le dépôt de cellules souches embryonnaires sur les lames coatées avec de la matrice extracellulaire produite par ces lignées cellulaires conduit à l'apparition de kératinocytes K14-positifs dès le huitième jour de culture en monocouche. Les différences
10 qualitative et quantitative sont représentées sur le tableau I.

Résultats obtenus avec la lignée de cellules souches embryonnaires D3 sur la matrice extracellulaire produite
15 par les lignées susmentionnées

[0045] La lignée D3 (Doetschman et al., *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27-45 (1985)) a été préalablement cultivée sur une couche nourricière de fibroblastes
20 embryonnaires murins.

[0046] Des résultats similaires à ceux obtenus avec la lignée de cellules souches embryonnaires CGR8 ont été obtenus.

[0047] Des résultats similaires à ceux obtenus avec
25 les matrices ont été observés en utilisant le milieu conditionné des mêmes lignées cellulaires.

[0048] La méthode selon présente invention présente donc l'avantage, par rapport à la méthode des gouttes pendantes telle qu'appliquée par Bagutti et al. (op. cit.)
30 pour induire la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris en kératinocytes, de permettre une obtention plus efficace et plus rapide de kératinocytes.

[0049] Ceci est particulièrement important dans les cas où il est nécessaire de produire en masse de tels

kératinocytes, comme par exemple dans le cas de la production de peau artificielle. La peau est en effet un organe constitué de trois tissus d'origines embryologiques différentes : l'ectoderme pour l'épiderme, le mésoderme
5 pour le derme et l'hypoderme. Les kératinocytes représentent 95% de la population épidermique et ils se renouvellent en permanence à partir d'une assise germinale basale suivant un programme de différenciation qui aboutit à la formation d'une couche cornée constituée de
10 cornéocytes.

[0050] La constitution de peau artificielle est une technologie ayant pour but de soigner des patients victimes de plaies thermiques, en particulier des grands brûlés, de plaies vasculaires telles que des ulcères, ou encore les
15 patients atteints de pathologies liées à des défauts de cicatrisation.

[0051] Trois types principaux de modèles pour reconstituer de la peau humaine en laboratoire sont actuellement disponibles et réalisables : les dermes
20 équivalents (Procacci et al., *J. Inv. Dermatol.* 115, 518 (2000); Bell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1274-1278 (1979) ; Bell et al., *J. Invest. Dermatol.* 81, 2s-10s (1983)), la peau composite dermo-épidermique allogénique (Burke et al., *Am. Surg.* 194, 413-428 (1981)) et
25 l'épiderme en culture allogénique (Hansbrough et al., *J. Am. Med. Ass.* 262, 2125-2140). Ces différents modèles sont préparés à partir de cultures primaires de kératinocytes et/ou fibroblastes.

[0052] Si ces modèles se prêtent bien à des études
30 pharmacologiques, leur utilisation à des fins thérapeutiques est néanmoins jugée insatisfaisante par un certain nombre d'équipes chirurgicales dans le monde, notamment parce qu'elle s'accompagne de rejet de greffes (Compron et al., *Lab. Invest.* 60, 600-612 (1989)).

[0053] L'autogreffe d'épiderme reconstitué à partir d'une biopsie cutanée sur le patient, suivie d'une culture des kératinocytes pendant environ trois semaines serait la meilleure solution, car elle éviterait tout risque de rejet
5 immunologique. Néanmoins, cette solution présente l'inconvénient d'être longue à mettre en œuvre.

[0054] A l'heure actuelle, pour le chirurgien, l'allogreffe expansée de peau de cadavre reste le meilleur substitut cutané. Cependant, cette solution n'est pas
10 viable à long terme car, outre le problème du manque de donneurs, cette solution expose le patient à une contamination virale potentielle.

[0055] C'est pourquoi, des efforts ont été entrepris afin de proposer une alternative à ces méthodes.

15 [0056] La culture de cellules souches embryonnaires humaines étant désormais possible en laboratoire, les méthodes représentées permettent l'obtention illimitée d'épidermes reconstitués greffables sans risque de rejet, les cellules embryonnaires souches présentant le double
20 avantage d'être « immortelles » sans être immortalisées et d'être aisément manipulables par transfection et recombinaison homologue. Pour que ces kératinocytes persistent chez le patient receveur, des modifications de certains loci, tels que celui des gènes du complexe majeur
25 d'histocompatibilité qui jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules étrangères par le système immunitaire, permettent de créer des lignées totipotentes universelles immunotolérantes.

Effet de différentes matrices sur la différenciation kératinocytaire

Matrices	J8	J15
Verre	-	-
Gélatine	-/+	+
FHN	+++	++++
3T3	+++	++++
804G	++	++
Rac11 P	++	++++
SCC25	++	+
MCF10	+++	+
KHSV	+++	+++
NBTII	+	+++
HaCaT	+	+

Les cellules ES ont été déposées sur des matrices sécrétées par des cellules d'origines différentes. La présence de
 5 kératinocytes néo-formés a été détectée à 8 (J8) et 15 jours (J15) par immunomarquage anti-kératine14.

La présence de cellules K14-positives est représentée quantitativement par:

(-) : absence de kératinocyte; (+) faible quantité de
 10 kératinocytes;
 quantités moyennes (++) , fortes (+++) et très fortes (++++) de kératinocytes.

Cette quantification représente les résultats de plusieurs expériences indépendantes, exécutées en triplicat.

15

Effets sur la différenciation d'additifs dans le milieu de culture

[0057] On a observé expérimentalement que les
 cellules souches embryonnaires (cellules ES) pouvaient être
 20 induites à se différencier en kératinocytes par l'ajout de

BMP-4 dans le milieu de culture, quelque soit le substrat sur lequel les cellules sont cultivées.

[0058] La BMP-4 est une protéine morphogène appartenant à la superfamille du TGF- β . Il est connu que
5 les cellules neuroectodermiques, au cours du développement embryonnaire précoce, deviennent soit épidermales soit neuronales, selon la concentration locale de BMP-4, la BMP-4 à hautes concentrations favorisant la formation de l'épiderme (Wilson P. et al. (1997) *Development* 124, 3177-
10 3184 ; Chang C. et al. (1997) *Development* 124, 827-837).

[0059] Selon le procédé de l'invention, on a, dès le retrait du facteur LIF, ajouté une solution de BMP-4 à 0.5nM diluée dans du PBS-BSA 0.1% au milieu de culture avec lequel les cellules embryonnaires souches sont cultivées en
15 monocouche, et on a renouvelé ce traitement tous les 2 jours. On a pu alors observé, par immunomarquage avec un anticorps anti-cytokératine-14, l'apparition d'une proportion importante de kératinocytes au 15^{ème} jour de traitement.

20 [0060] Il a également été observé que si, au lieu d'ajouter au milieu de culture une solution de BMP-4, on ajoute dans les mêmes conditions une solution contenant 50 μ g/ml d'acide ascorbique, une proportion importante de kératinocytes au 15^{ème} jour de traitement apparaissait.

25 [0061] En outre, le dépôt en absence de LIF de cellules souches indifférenciées, cultivées sur un derme équivalent ou dé-épidermisé, permet la formation d'une bicouche de cellules différenciées en kératinocytes dès le 8^{ème} jour de culture en immersion. Par immunofluorescence,
30 toutes les cellules qui adhèrent au substrat dermique se sont en effet révélées positives pour la cytokératine-14. Au bout de 14 jours supplémentaires de culture des cellules en interface air-liquide selon la méthode décrite par

Basset-Seguin N. et al. (Basset-Seguin N. et al. (1990) Differentiation 44, 232-238), il est possible d'obtenir un épiderme stratifié présentant tous les marqueurs spécifiques des différentes couches cellulaires de l'épiderme murin, ainsi que le dépôt par la couche basale de laminine-5 au niveau de la lame basale.

[0062] Comparativement, l'ajout de BMP-4 dans le milieu de culture des cellules embryonnaires souches, dès le dépôt sur le derme équivalent, permet l'obtention d'une bicouche de cellules différenciées en kératinocytes dès le 4^{ème} jour de culture en immersion.

REVENDEICATIONS

1. Méthode d'induction de la différenciation de cellules souches embryonnaires de mammifères en kératinocytes, comprenant les étapes suivantes :

- 5 - isolement d'une matrice extracellulaire sécrétée par au moins un type de cellules de mammifères,
- culture en parallèle des cellules souches embryonnaires de mammifères à l'état indifférencié dans un milieu de culture approprié en présence de LIF,
- 10 - ensemencement des cellules souches embryonnaires en monocouche sur ladite matrice extracellulaire,
- culture des cellules souches embryonnaires ainsi ensemencées en absence de LIF pendant un délai suffisant pour leur différenciation en kératinocytes, et
- 15 - recueillement des kératinocytes ainsi obtenus.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que les cellules souches embryonnaires sont maintenues préalablement à l'état indifférencié à l'aide du facteur LIF, à une concentration de l'ordre de
20 10^3 unités/ml de culture.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le délai de culture des cellules souches embryonnaires ensemencées sur la matrice extracellulaire est efficace dès le 8^{ème} jour et inférieur à
25 21 jours.

4. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules souches embryonnaires ensemencées sur la matrice extracellulaire sont cultivées en présence de BMP-4 ou d'acide ascorbique.

30 5. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules dont on récupère la matrice extracellulaire sont des cellules humaines, à l'exception des cellules germinales.

6. Procédé de fabrication d'une peau artificielle à partir de cellules souches embryonnaires de mammifères, comprenant les étapes suivantes :

- on induit la différenciation desdites cellules souches embryonnaires en kératinocytes à l'aide de la méthode selon l'une des revendications précédentes ;
 - on poursuit la culture des cellules différenciées en interface air-liquide pendant un temps suffisant pour obtenir la formation d'un épiderme artificiel stratifié.
7. Peau artificielle obtenue à partir de la méthode selon l'une des revendications précédentes.